

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶: C12N 15/87, C07K 14/02, C12N 15/36, 15/86, A61K 48/00, 47/48	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 95/06745 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 9. März 1995 (09.03.95)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE94/01003 (22) Internationales Anmeldedatum: 24. August 1994 (24.08.94) (30) Prioritätsdaten: P 43 29 811.7 3. September 1993 (03.09.93) DE P 43 39 922.3 19. November 1993 (19.11.93) DE (71) Anmelder: MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V. (DE/DE); Hofgartenstrasse 2, D-80539 München (DE). (72) Erfinder: STRAUSS, Michael; Parkstrasse 3, D-13187 Berlin (DE). SANDIG, Volker; Robert-Rössle-Strasse 10, D- 13125 Berlin (DE). HOFMANN, Christian; Robert-Rössle- Strasse 10, D-13125 Berlin (DE). (74) Anwalt: BAUMBACH, Fritz; BioTeZ Berlin-Buch GmbH, Patzschelle, Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>	
(54) Title: VECTOR FOR GENE THERAPY OF THE LIVER		
(54) Bezeichnung: VEKTOR FÜR LEBER-GENTHERAPIE		
(57) Abstract		
<p>A liver-specific, gene therapy vector finds applications in medicine and genetic engineering. The object of the invention is to develop a vector that finds liver cells with high specificity, is effectively absorbed by the cells and may inject the imported therapeutic genes into the cell nucleus. The vector should be suitable for the gene therapy of human beings. The vector according to the invention is characterised in that a therapeutic gene coupled to a promoter is packed in a polypeptide sheath and coupled to components of hepatitis B virus.</p>		
(57) Zusammenfassung		
<p>Die Erfindung betrifft einen Vektor für die leberspezifische Gentherapie; Anwendungsgebiete sind die Medizin und die Gentechnik. Ziel der Erfindung ist die Konstruktion eines Vektors, der Leberzellen hochspezifisch findet, von den Zellen effektiv aufgenommen wird und eingebrachte therapeutische Gene in den Zellkern einschleusen kann. Der Vektor soll für die Gentherapie beim Menschen einsetzbar sein. Der erfindungsgemäße Vektor ist dadurch gekennzeichnet, daß ein therapeutisches, an einem Promotor gekoppeltes Gen mit einer Polypeptidhülle verpackt und an Komponenten des Hepatitis-B-Virus gekoppelt wird.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäÙ dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauritien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisien	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TT	Tschad und Tobago
DE	Deutschland	MC	Monaco	UA	Ukraine
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	US	Vereinigte Staaten von Amerika
ES	Spanien	MG	Madagaskar	UZ	Usbekistan
FI	Finnland	ML	Mali	VN	Vietnam
FR	Frankreich	MN	Mongolei		

Vektor für Leber-Gentherapie

Beschreibung

Die Erfindung betrifft einen Vektor für die leberspezifische Gentherapie; Anwendungsgebiete sind die Medizin und die Gentechnik.

In den vergangenen Jahren sind zahlreiche Methoden und Vektoren für die Gentherapie entwickelt worden (Übersicht in Mulligan /1993/ Science 260, 926). Dabei werden viele Vektoren, vor allem solche, die von Retroviren oder Adenoviren abgeleitet sind, favorisiert. Beide Virus-Vektortypen sind relativ breit anwendbar, wobei retrovirale Vektoren nur bei teilungsfähigen Zellen effektiv sind und Adenoviren auch bei ruhenden Zellen funktionieren. Beide Vektortypen sind zwar für die Genübertragung in Leberzellen (Hepatozyten) in vitro geeignet, können aber für eine in vivo Anwendung zur Gentherapie beim Menschen kaum in Betracht gezogen werden. Während für die Anwendung retroviraler Vektoren eine Leberteilresektion zur Stimulierung von Zellteilung (Regeneration) erforderlich wird, ist der adenovirale Gentransfer nicht sehr stabil (keine Integration in das Genom).

Alternative Vektoren mit potentieller Anwendbarkeit für den Lebergentransfer basieren auf Liposomen oder auch auf Multikomponenten-Partikeln mit Proteindomänen, die spezifisch an bestimmte Rezeptoren der Leber (z.B. Asialoglykoprotein-Rezeptor) binden und durch deren Internalisierung in die Zelle aufgenommen werden können (Übersicht in: Versland et al /1992/ Seminars in Liver Disease 12, 332). Ein wesentlicher Nachteil dieser Vektoren besteht in der Aufnahme über den endozytischen Weg, der zu einer Degradation eines großen Teils der Vektoren und ihrer DNA in den Endosomen führt, so daß nur wenig funktionsfähige DNA den Zellkern erreichen kann.

Eine Lösung für dieses Problem wurde zwar für die in vitro Anwendung gefunden; diese ist aber nicht auf die Situation in vivo (am Patienten) anwendbar. Sie basiert auf der gleichzeitigen Infektion der Zielzellen mit Adenovirus, was zur Auflösung der Endosomen und Freisetzung von Vektor (DNA) führt. (Curiel, D.T., Agrawal, S., Wagner, E. und Cotten, M. 1991, PNAS 88, 8850-8854).

Ziel der Erfindung ist die Konstruktion eines Vektors, der Leberzellen in vivo hochspezifisch findet, von den Zellen effektiv aufgenommen wird und eingebrachte therapeutische Gene in den Zellkern einschleusen kann. Der Vektor soll für die Genthherapie beim Menschen einsetzbar sein.

Die Erfindung wird gemäß Anspruch 1 realisiert, die Unteransprüche 2 - 9 sind Vorzugsvarianten.

Erfindungsgemäß wird ein therapeutisches Gen, das an einen Promoter gekoppelt ist, in eine Polypeptidhülle verpackt und mit Proteindomänen des HBV chemisch, enzymatisch oder über Antikörper gekoppelt. Als therapeutisches Gen wird die cDNA eines Gens verwendet, das bei der zu behandelten Krankheit defekt ist, d. h. fehlt oder durch Mutation verändert ist.

Beispiele für solche Gene sind das LDL-Rezeptor-Gen, dessen Fehlen die häufigste Stoffwechselerkrankung der Leber, die familiäre Hypercholesterinämie, verursacht, und das Alpha-1-Antitrypsin-Gen.

Als Promotoren dienen leberspezifische Promotoren, bevorzugt Promoter/Enhancer des Hepatitis-B-Virus wie z.B. die Kombinationen core-Promoter/ enhancer II. Sie sind neben ihrer Spezifität auch klein genug, um leicht in einen Expressionsvektor eingebaut werden zu können. Auch in Betracht für die Konstruktion des erfindungsgemäßen Vektors kommen Promotoren leberspezifischer Gene wie Albumin, PEPCK (Phosphoenolpyruvat-carboxykinase) oder OTC (Ornithintranscarbamylase).

Die für die Verpackung verwendete Polypeptidhülle besteht vorzugsweise aus chromosomalem Protein wie z. B. gereinigtem HMGl. Gleichermäßen geeignet sind auch andere DNA-bindende Proteine wie z. B. Protamine oder Hepatitis-core-Protein. Dieses Protein ist deshalb besonders geeignet, weil es außer seiner DNA-Bindungs- und DNA-Kondensationsfähigkeit eine natürliche Komponente des Hepatitis-B-Virus ist und deshalb den Einbau in Virushüllen begünstigt.

Die Polypeptidhülle kann gemäß der Erfindung auch aus Polyaminosäuren eines Typs basischer Aminosäuren hergestellt werden, wobei sich in erster Linie Poly-L-Lysin und Poly-L-Ornithin eignen.

Das erfindungsgemäß als gekoppelte Komponente eingesetzte partikuläre prä-S1/S-Protein des Hepatitis-B-Virus kann aus Virus-produzierenden Zellen isoliert werden. Prä-S1/S-Protein wird aber aus Sicherheitsgründen vorteilhafterweise gentechnisch hergestellt. Derartige Nukleinsäure-freie Partikel stellen von der äußeren Oberfläche gesehen eine vollständige Virushülle dar. Damit hat der resultierende Vektor eine hohe Homologie zum natürlichen Hepatitis-B-Virus und kann deshalb den Infektionsmechanismus nachvollziehen.

Anstelle der Verwendung der kompletten Virushüllproteine läßt sich die Erfindung auch mit Liposomen als Transportvehikeln realisieren. Dabei wird die Oberfläche der verwendeten Liposomen durch prä-S1/S-Protein so modifiziert, daß eine Aufnahme über Hepatitis-B-spezifischen Mechanismen möglich ist.

Die Herstellung der Vektoren erfolgt gemäß Anspruch 10, die Unteransprüche 11 - 13 sind Vorzugsvarianten. Ein vorteilhaftes Verfahren besteht z.B. darin, daß die Kopplung des in HMG1 verpackten Gens an prä-S/S1-Proteine des HBV kovalent mittels Transglutaminase-Reaktion erfolgt.

Der erfindungsgemäße Vektor ermöglicht, ein gewünschtes Gen in das Gewebe, insbesondere die Leber eines Patienten einzuführen und seinen Weg zum Funktionsort optimal zu gestalten. Das erfolgt beispielsweise dadurch, daß der Vektor konfektioniert und einem Patienten über die Blutbahn, vorzugsweise über die Portalvene der Leber, verabreicht wird. Mit der Erfindung wird eine wesentliche Voraussetzung für eine Therapie genetischer Erkrankungen der Leber geschaffen.

Die Erfindung soll nachfolgend durch ein Ausführungsbeispiel näher erläutert werden.

Anwendungsbeispiel

1. Expression von HBV-Hüllproteinen in Insektenzellen

Die Hülle des HBV-Virus besteht aus drei Proteinen. Sie sind Translationsprodukte eines offenen Leserahmens im HBV-Genom mit unterschiedlichen Initiationsstellen. Während das große Hüllprotein (L: P39, GP42) die Domänen Prä-S1, Prä-S2 und S enthält, besteht das mittlere (M: P33, GP36) aus Prä-S2 und S und das kleine Hüllprotein (S: P24, GP27) nur aus der Domäne S.

Die Gene des kleinen (S) und großen (L) HBV-Hüllproteins werden durch Amplifikation aus dem Genom des Hepatitis B Virus (Subtyp ayw) gewonnen. Für das L-Gen werden verschiedene Varianten erstellt, um die Sekretion des Proteins zu erleichtern. Sie kodieren für ein N-terminal verkürztes L-Protein (Deletion der Aminosäuren 1-6), ein L-Protein, dessen Myristilierungsort mutiert wird (Aminosäure 2 Gly-->Ala) bzw. eine Fusion mit der Melittin-Signalsequenz.

Alle Gene werden einzeln in den Baculovirus-Transfervektor PVL941 (Pharmingen) kloniert und stehen unter Kontrolle des Polyhedrin-Promoters. Nachträglich wird ein DNA-Fragment, bestehend aus dem Polyhedrin-Promoter und dem S-Gen in alle Vektoren, die Varianten des L-Gens enthalten, derart eingefügt, daß beide Expressionseinheiten in gleicher Orientierung vorliegen und von Baculovirus-Sequenzen flankiert sind.

Die rekombinanten Plasmide und Baculovirus-DNA (BaculoGold, Pharmingen) werden mit Lipofectin in *Spodoptera frugiperda*-Zellen (Sf9) kotransfiziert. Durch homologe Rekombination zwischen Plasmid und Virus-DNA werden rekombinante Baculoviren erzeugt, welche die HBV-Hüllproteine unter Kontrolle des Polyhedrinpromoters in infizierten Sf9-Zellen exprimieren. Die Synthese dieser Proteine wird im Westernblot nachgewiesen. Elektronenmikroskopisch wird gezeigt, daß die Hüllproteine zu Partikeln assoziieren.

Nach wiederholter Passagierung der Viren auf Sf9-Zellen werden Spinnerkulturen (10⁹ Sf9-Zellen) infiziert. 72 Stunden nach Infektion werden die Zellen durch Sedimentation gewonnen und mittels Ultraschall aufgeschlossen. Nach Abtrennung von Membranen durch Sedimentation erfolgt die Reinigung der Hüllpartikel

wahlweise durch Zentrifugation im CsCl-Dichtegradienten oder durch Affinitätschromatografie. Hierbei finden S-spezifische monoklonale Antikörper Anwendung.

2. Expression und Reinigung von HMGI

Das Gen des Nucleohistonproteins HMGI der Ratte wird aus dem Vektor zur bakteriellen Expression pT7RNHMGI [Bianchi, E., Gene, 104 (1991) 271-275] entnommen und in den Baculovirus-Transfervektor PVL941 kloniert. Rekombinante Baculoviren werden nach dem für HBV-Gene beschriebenen Verfahren erzeugt. Der Expressionsnachweis erfolgt durch Coomassiefärbung der Proteine nach SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.

Zur Reinigung von Ratten-HMGI aus infizierten Sf9-Zellen wird ein Zelllysat durch Aufschluss mit Ultraschall erzeugt, Membranen durch Sedimentation abgetrennt und das Lysat mit 2% TCA gefällt. Der Überstand wird anschließend einer Azetonfällung im sauren Milieu unterzogen. Das entstehende Präzipitat wird gelöst und durch Ionenaustauschchromatographie über eine Mono Q-Säule im Kochsalzgradient fraktioniert. Die bei 1,7M NaCl eluierte Fraktion enthält elektrophoretisch reines HMGI.

3. Herstellung von DNA-HMGI-Komplexen

Nach Böttger et al. [Biochim. Biophys. Acta 950 (1988) 221-228] wird Plasmid-DNA der Form 3 sequenzunabhängig von HMGI gebunden und kondensiert.

Die Bildung der DNA-Protein-Komplexe erfolgt durch schrittweise Zugabe eines zwanzigfachen Masseüberschusses an HMGI zu einer DNA-Lösung von 50 µg/ml in 150mM NaCl 10mM Tris/HCl bei pH 8,0. DNA-Bindung und Kondensation werden durch Gelretardation und Sedimentation im Saccharosegradienten nachgewiesen.

4. Bindung von DNA-HMGI-Komplexen an HBV-Partikel

HBV-Hüllproteine werden mittels Transglutaminase kovalent mit HMGI vernetzt. In dieser Reaktion treten ε-Aminogruppen der Lysin im HMG-Molekül als Acyl-Akzeptor und γ-Karboxamidgruppen der Glutaminreste im HBV-L und S-Protein als Acyldonor auf.

Die Reaktion wird 1h bei 37°C in 150mM NaCl, 10mM CaCl₂, 20mM Tris/HCl pH 8,0 mit 0,5 Einheit n Meerschweinchen-Transglutaminase bei einem Masseverhältnis von HMG1 : HBVL+S = 10:1 durchgeführt.

5. Infektion primärer humaner Hepatozyten mit dem Gentransfervektor

Eine konfluente Monolayerkultur humaner Hepatozyten wird 5 Tage nach Anlage für 12 Stunden mit dem Transfervektor infiziert. Das Plasmid pBAG [Proc. Natl. Acad. Sci. 84 (1987) 156-160], das das Gen der β -Galaktosidase aus *E.coli* unter Kontrolle eines retroviralen LTR enthält, wird in den Vektor verpackt. Der Nachweis des Gentransfers erfolgt 48 Stunden nach Infektion durch den *in situ*-Enzymtest für β -Galaktosidase.

Patentansprüche

1. Vektor für die gewebespezifische Gentherapie, gekennzeichnet dadurch, daß ein therapeutisches Gen, das an einen Promoter gekoppelt ist, mit einer Polypeptidhülle verpackt und an Komponenten des Hepatitis B-Virus gekoppelt wird.

2. Vektor für die leberspezifische Gentherapie nach Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, daß ein therapeutisches Gen, das an einen Promoter gekoppelt ist, mit einer Polypeptidhülle verpackt und an Komponenten des Hepatitis B-Virus gekoppelt wird.

3. Vektor nach Anspruch 1 und 2, gekennzeichnet dadurch, daß als therapeutisches Gen die cDNA eines Gens verwendet wird, das bei der zu behandelnden Krankheit defekt ist.

4. Vektor nach Anspruch 1 bis 3, gekennzeichnet dadurch, daß als Promotor ein leberspezifischer Promoter, bevorzugt ein Promoter/Enhancer von Hepatitis B verwendet wird.

5. Vektor nach Anspruch 1 bis 4, gekennzeichnet dadurch, daß die Polypeptidhülle aus einem chromosomalen Protein, vorzugsweise aus gereinigtem HMG1, besteht.

6. Vektor nach Anspruch 1 bis 5, gekennzeichnet dadurch, daß die Polypeptidhülle aus core-Protein von Hepatitis B besteht.

7. Vektor nach Anspruch 1 bis 5, gekennzeichnet dadurch, daß die Polypeptidhülle aus Polyaminosäuren eines Typs basischer Aminosäuren hergestellt wird.

8. Vektor nach Anspruch 1 bis 7, gekennzeichnet dadurch, daß als gekoppelte Komponente partikuläres prä-S1/S-Protein des Hepatitis B-Virus eingesetzt wird.

9. Vektor nach Anspruch 1 bis 8, gekennzeichnet dadurch, daß als gekoppelte Komponente Liposomen mit gebundenem prä-S1-Peptid eingesetzt werden.
10. Verfahren zur Herstellung des Vektors nach Anspruch 1 bis 9, gekennzeichnet dadurch, daß die Kopplung des verpackten Gens an die Komponente(n) des Hepatitis B-Virus chemisch, enzymatisch oder über Antikörper durchgeführt wird.
11. Verfahren zur Herstellung nach Anspruch 10, gekennzeichnet dadurch, daß die Kopplung mit einem bifunktionellen Linker, 3bevorzugt SPDP, durchgeführt wird.
12. Verfahren zur Herstellung nach Anspruch 10, gekennzeichnet dadurch, daß die Kopplung mit Transaminase durchgeführt wird.
13. Verfahren zur Herstellung nach Anspruch 10, gekennzeichnet dadurch, daß die Kopplung mit bispezifischen Antikörpern durchgeführt wird.
14. Verfahren zur Anwendung des Vektors nach Anspruch 1 bis 9, gekennzeichnet dadurch, daß der Vektor konfektioniert und einem Patienten über die Blutbahn, vorzugsweise über die Portalvene der Leber, verabreicht wird.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DE 94/01003

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/87 C07K14/02 C12N15/36 C12N15/86 A61K48/00
A61K47/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CELL, vol. 46, 1986, CAMBRIDGE, MA US pages 429 - 436 NEURATH A. R. ET AL. 'Identification and chemical synthesis of a host cell receptor binding site on hepatitis B virus' see the whole document	1-7, 10-14
Y	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 267, no. 3, January 1992, BALTIMORE, MD US pages 1953 - 1961 KURODA S. ET AL. 'Hepatitis B virus envelope L protein particles' see the whole document	1-7, 10-14
-/-		



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 November 1994

Date of mailing of the international search report

14 -12- 1994

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.O. Box 5818 Patenthaus 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-3040, Tr. 31 651 epo nl
Fax (+ 31-70) 340-3036

Authorized officer

Espen, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/DE 94/01003

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	VACCINE, vol.7, 1989, GUILDFORD GB pages 60 - 68 YOUN B. W. ET AL. 'Purification and characterization of pre-S-containing hepatitis B surface antigens produced in recombinant mammalian cell culture' see the whole document ---	1-7, 10-14
Y	DNA, vol.7, 1988 pages 417 - 422 PRICE P. M ET AL. 'Translational selection in the expression of the hepatitis B virus envelope proteins' see the whole document ---	1-7, 10-14
Y	BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol.950, 1988 pages 221 - 228 BÖTTGER M. ET AL. 'Condensation of vector DNA by the chromosomal protein HMGI results in efficient transfection' cited in the application see the whole document ---	1-7, 10-14
Y	ARCHIV FÜR GESCHWULSTFORSCHUNG, vol.60, 1990 pages 265 - 270 BÖTTGER M. ET AL. 'Transfection by DNA-nuclear protein HMGI complexes: raising of efficiency and role of DNA topology' ---	1-7, 10-14
Y	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol.267, no.16, 1992, BALTIMORE, MD US pages 11483 - 11489 WILSON J.M. ET AL. 'A novel mechanism for achieving transgene persistence in Vivo after somatic gene transfer into hepatocytes' see the whole document ---	1-7, 10-14
Y	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol.90, March 1993, WASHINGTON US pages 2122 - 2126 CHRISTIANO R. J. ET AL. 'Hepatic gene therapy: adenovirus enhancement of receptor-mediated gene delivery and expression in primary hepatocytes' see the whole document ---	1-7, 10-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DE 94/01003

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Remark: Although Claim 14 is directed to a method for treatment of the human or animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 6 C12N15/87 C07K14/02 C12N15/36 C12N15/86 A61K48/00 A61K47/48		
Nach der Internationalen Patentreklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationsystem und Klassifikationsymbole) IPK 6 C12N C07K A61K		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	CELL, Bd. 46, 1986, CAMBRIDGE, MA US Seiten 429 - 436 NEURATH A. R. ET AL. 'Identification and chemical synthesis of a host cell receptor binding site on hepatitis B virus' siehe das ganze Dokument	1-7, 10-14
Y	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY., Bd. 267, Nr. 3, Januar 1992, BALTIMORE, MD US Seiten 1953 - 1961 KURODA S. ET AL. 'Hepatitis B virus envelope L protein particles' siehe das ganze Dokument	1-7, 10-14
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfälle		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : 'A' Veröffentlichung, die dem allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist 'B' älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist 'L' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelsfrei zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die zu einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie angeführt) 'O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausübung oder andere Maßnahmen bezieht 'P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist		
* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann einleuchtend ist *A* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Abschlußdatum des internationalen Recherchenberichts
24. November 1994		14-12- 1994
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 3118 Patentstr. 1 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-3000, Tlx. 31 651 epo nl, Fax: (+ 31-70) 340-3016		Berechtigter Beauftragter Espan, J

C(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	VACCINE, Bd.7, 1989, GUILDFORD GB Seiten 60 - 68 YOUN B. W. ET AL. 'Purification and characterization of pre-S-containing hepatitis B surface antigens produced in recombinant mammalian cell culture' siehe das ganze Dokument	1-7, 10-14
Y	DNA, Bd.7, 1988 Seiten 417 - 422 PRICE P. M ET AL. 'Translational selection in the expression of the hepatitis B virus envelope proteins' siehe das ganze Dokument	1-7, 10-14
Y	BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, Bd.950, 1988 Seiten 221 - 228 BÖTTGER M. ET AL. 'Condensation of vector DNA by the chromosomal protein HMGI results in efficient transfection' in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument	1-7, 10-14
Y	ARCHIV FÜR GESCHMULSTFORSCHUNG, Bd.60, 1990 Seiten 265 - 270 BÖTTGER M. ET AL. 'Transfection by DNA-nuclear protein HMGI complexes: raising of efficiency and role of DNA topology'	1-7, 10-14
Y	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd.267, Nr.16, 1992, BALTIMORE, MD US Seiten 11483 - 11489 WILSON J.M. ET AL. 'A novel mechanism for achieving transgene persistence in Vivo after somatic gene transfer into hepatocytes' siehe das ganze Dokument	1-7, 10-14
Y	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, Bd.90, März 1993, WASHINGTON US Seiten 2122 - 2126 CHRISTIANO R. J. ET AL. 'Hepatic gene therapy: adenovirus enhancement of receptor-mediated gene delivery and expression in primary hepatocytes' siehe das ganze Dokument	1-7, 10-14

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr. weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Bemerkung : Obwohl der Anspruch 14 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers bezieht, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☐ Ansprüche Nr. weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr. weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefodert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.